

# ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕВОМИЦЕТИНА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЭЖХ

*Ершик В.М., Моисеев Д.В., Жебентяев А.И.  
УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

Согласно [1] генерические лекарственные средства должны удовлетворять тем же стандартам качества, эффективности и безопасности, что и оригинальные лекарственные средства. При проведении регистрации генерических лекарственных средств необходимо убедительное подтверждение того, что они эквивалентны, ранее зарегистрированным аналогичным лекарственным средствам и клинически взаимозаменяемы с ними.

Подтверждением эффективности генерических лекарственных средств является исследование их биоэквивалентности в сравнении с зарегистрированными ранее лекарственными средствами, содержащими такое же количество действующего вещества (если сравниваемые лекарственные средства имеют одинаковую лекарственную форму). Такой подход позволяет сделать обоснованный вывод об эффективности генерических лекарственных средств по меньшему объему первичной информации и в более сжатые сроки, чем проведение клинических испытаний.

Одним из этапов оценки биоэквивалентности лекарственных средств является аналитический этап, который включает разработку или адаптацию методики количественного определения лекарственного средства или его метаболитов в сыворотке крови и ее валидацию.

**Цель:** валидация методики количественного определения левомецитина в сыворотке крови, пригодной для проведения исследования биоэквивалентности оригинальных и генерических таблеток левомецитина.

**Материалы и методы.** В работе использовали аналитический стандартный образец сульфаметоксазола и стандартный образец левомецитина. Реактивы: ацетонитрил для ВЭЖХ «Меск», натрия сульфат «ч.д.а.», вода бидистиллированная, кислота фосфорная «ч.д.а.». Исследование проводилось на жидкостном хроматографе Agilent 1100 – четырехградиентный насос, термостат колонок, автосамплер, детектор на основе диодной матрицы. Аналитическая колонка – Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 4,6×150mm, 5 мкм.

Методика количественного определения левомецитина в сыворотке крови для проведения биоэквивалентных исследований. На основании результатов предварительных исследований по оптимизации методики количественного определения левомецитина в сыворотке крови использована следующая методика: 1,0 мл сыворотки крови помещают во флакон из стеклорота объемом 20 мл, прибавляют 200 мкл этанольного раствора сульфаметоксазола с концентрацией 25,0 мг/мл (внутренний стандарт), 3,0 мл ацетонитрила и 1 г натрия сульфата. Флакон герметично укупоривают и интенсивно встряхивают в течение 50 секунд. Полученную смесь центрифугируют (3000 об/мин – 15 мин), затем 2,5 мл супернатанта переносят в центрифужные пробирки объемом 10 мл и упаривают досуха в токе воздуха при 45°C. К сухому остатку прибавляют 0,5 мл смеси вода-ацетонитрил (75:25) и аликвоту в 10 мкл вводят в хроматографическую систему. Хроматогра-

фирование проводят при температуре колонки 30°C. Подвижная фаза: вода, подкисленная ортофосфорной кислотой до значения pH 2-3 – ацетонитрил (77:23 по объему), расход элюента 1,0 мл/мин. Детектирование осуществляют при длине волны  $\lambda=278$ . Расчет содержания левометицина в сыворотке проводят по градуировочному графику зависимости концентрации левометицина от отношения площадей хроматографических пиков левометицина и сульфаметоксазола (внутренний стандарт). Основные данные по валидации [2] представлены ниже.

**Селективность:** разрешение хроматографических пиков левометицина и сульфаметоксазола с соседними составляет более 1,5; на хроматограммах нулевых образцов отсутствуют хроматографические пики со временем удерживания 7,9 мин и 6,1 мин, соответствующим временам удерживания левометицина и сульфаметоксазола.

**Правильность и внутрилабораторная точность:** результаты количественного определения левометицина в сыворотке крови по методу «введено-найденно» представлено в таблице 1 (в разные дни).

Таблица 1 - Результаты количественного определения левометицина в сыворотке крови ( $P=0,95$ ;  $n=9$ )

Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл $\bar{X} \pm \Delta\bar{X}$	$S_R$	R, %	$\delta$ , %
0,39	0,36 $\pm$ 0,02	0,076	95,7	-6,78
0,78	0,77 $\pm$ 0,02	0,044	100,6	0,71
1,56	1,60 $\pm$ 0,03	0,025	104,5	2,45
3,13	3,17 $\pm$ 0,06	0,028	103,7	1,37
6,25	6,31 $\pm$ 0,14	0,032	101,0	0,96
12,5	12,48 $\pm$ 0,29	0,033	99,8	-0,17
25,0	24,95 $\pm$ 0,57	0,033	99,8	-0,21

**Линейный диапазон определяемых содержаний.** Левометицин в сыворотке крови определяют по градуировочному графику  $C = b \cdot K_r$ , где  $b$  – угловой коэффициент градуировочного графика;  $C$  – концентрация левометицина в сыворотке, мг/мл;  $K_r$  – отношение площадей хроматографических пиков левометицина и сульфаметоксазола (внутренний стандарт).

Линейный диапазон определяемых концентраций левометицина по использованной методике составляет 0,39 – 25,00 мг/мл, нижняя граница определяемых содержаний левометицина – 0,39 мг/мл, предел обнаружения (при соотношении сигнал/шум=3) – 0,09 мг/мл.

**Стабильность растворов.** Градуировочные растворы для сыворотки крови готовили из рабочего раствора и сыворотки крови добровольцев, взятой до приема лекарственного средства левометицина, после чего их замораживали и хранили в жидком азоте.

Пробы сыворотки замораживали в жидком азоте, затем размораживали и анализировали. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты определения левометицина (R, %) в сыворотке крови после замораживания/размораживания образцов

Введено, мкг/мл	однократная заморозка/разморозка	двукратная заморозка/разморозка	трехкратная заморозка/разморозка
0,39	93	110	85
12,5	101	96	94
25,0	105	98	95

Растворы стандартных образцов левометицина (сульфаметоксазола) готовили путем взятия точной навески и растворения ее в воде (96% этаноле). Приготовленные растворы стабильны не менее 30 дней при хранении их при температуре 18-20°C. Хранение подготовленных проб перед анализом методом ВЭЖХ без изменения результатов количественного определения достигалось в течение 24 часов.

**Робастность методики.** Эффективность колонки по левометицину составила 7700-8600 теоретических тарелок при относительном стандартном отклонении в течение 10 дней анализов – 0,05. Исследованы составы подвижной фазы, отличающиеся на  $\pm 2\%$  от указанных в методике хроматографического анализа. Разрешение пиков левометицина и внутреннего стандарта при этом остается достаточным для проведения количественного определения (значение Rs составляет 4,63-6,90).

**Выводы.** Разработанная методика позволяет провести испытания биоэквивалентности левометицина в соответствии с принципами и надлежащей лабораторной практики (GLP) и обеспечить надежное количественное определение лекарственного вещества в сыворотке крови человека.

Литература:

- 1 Государственная фармакопея Республики Беларусь / под ред. Г.В. Годовальникова. — 1 изд. — Минск, 2006. — 1345 с.
2. Guidance for Industry Bioanalytical Methods Validation, 2001 — 21 p